Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Erlangen.
Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Jamin.

Beitrag zum Nachweis der Tuberkelbazillen im Auswurf

(Trypaflavin — Gegenfärbung)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexanders-Universität zu Erlangen

vorgelegt von

Erich Mottel
Medizinalpraktikant aus Dortmund

Tag der mündlichen Prüfung: 5. November 1938.

1938

Druckerei und Verlag wissenschaftlicher Werke Konrad Triltsch,
Würzburg-Aumühle

1939 M 73

Referent:
Geheimrat Professor Dr. Jamin.

Dekan:
Professor Dr. Greving.

Die große Bedeutung, die der frühzeitigen Auffindung der Tuberkelbazillen im Sputum, bei der Diagnose der offenen Lungentuberkulose zukommt, gab den Anlaß, daß immer wieder neue Untersuchungen vorgenommen wurden, eine sichere und schnelle Färbemethode zu finden.

Man war bestrebt, dem Praktiker leicht anwendbare Färbungen zur Tuberkelbazillenauffindung an die Hand zu geben, um es ihm so zu ermöglichen, innerhalb der Sprechstunde, in wenigen Minuten, die sichere Diagnose: offene Lungentuberkulose stellen zu können.

Die Erfahrungen zeigen, daß die Praktiker meist erst dann daran denken, ein Sputum zur bakteriologischen Untersuchung einzuschicken, oder selbst zu untersuchen, wenn sie durch andere Erscheinungen auf die Diagnose Tuberkulos gekommen sind, statt grundsätzlich bei jedem Katarrh das Sputum — möglichst gleich in der Sprechstunde — zu beachten und sofort zu untersuchen.

Weiterhin bedingen folgende Gründe die Notwendigkeit, eine sichere und schnelle Untersuchungsmethode zu organisieren.

1. Da die Lungentuberkulose seltener geworden ist, muß man bei jedem Einzelfall auf die schnelle spezifische Diagnose bedacht sein.
2. Da man jetzt weiß, daß der entscheidend verschlimmernde Schub der Lungentuberkulose immer, aber oft nur sehr kurze Zeit (Tage oder Wochen) mit Bazillenausscheidung einhergeht, muß möglichst der zuerst untersuchende Arzt schon darnach fahnden.
3. In diesen alltäglichen Auswurfarten von Grippe, Bronchialkatarrh, fieberhaftem Schnupfen sind die Tuberkelbazillen zwar meist deutlich, aber doch oft nur spärlich nachzuweisen.

Seit der Entdeckung der Tuberkelbazillen durch Robert Koch sind daher annähernd 100 Färbungen ausgearbeitet worden, die allerdings zum größten Teil auf die bekannteste, die Ziehl-Neelsen'sche zurückgehen. Robert Koch's Versuche ergaben, daß mit den gewöhnlich benützten Anilinfarben und den sonstigen Kernfärbemitteln die Tuberkelbazillen nicht erkannt werden konnten, daß diese aber sofort in vollster Deutlichkeit hervortreten, wenn den Lösungen der Anilinfarbstoffe eine kleine Menge Alkali zugesetzt wird. Die späteren Untersuchungen zeigten, daß statt

des Alkalizusatzes auch ein solcher von Carbolsäure oder Ammoniak in ähnlicher Weise das Eindringen des Farbstoffes in die Tuberkelbazillen erleichtert, auch ohne allen Zusatz gelang schließlich die Färbung der Bazillen, wenn die Einwirkung des Farbstoffes nur hinreichend intensiv war, sodaß also im wesentlichen quantitative Differenzen in Bezug auf die Farbstoffaufnahme vorliegen. Das besondere Merkmal der Tuberkelbazillenfärbung ist die Tatsache, daß die einmal in die Bazillen gelangte Farbstoffe bei der Entfärbung des übrigens Gewebes und der Kerne durch Anwendung von starker Salpeter- oder Salzsäure, nicht entfernt werden, sodaß dann die Tuberkelbazillen allein gefärbt bleiben. Durch diese Färbung heben sich die Bazillen in dem nunmehr farblosen Gewebe schon vorzüglich ab. Eine weitere Verschärfung des Bildes ist dann noch dadurch zu erzielen, daß nach der Anwendung des Entfärbemittels der Sputumausstrich mit einer der gewöhnlichen kernfärbenden Anilinfarblösungen gegengefärbt wird, wenn deren Farbenton einen guten Kontrast gegenüber der zuerst zur Färbung der Tuberkelbazillen benutzten Farblösung liefert.

Im Lauf der Jahre entwickelte sich die von Ziehl-Neelsen' beschriebene Färbemethode, wegen der Beständigkeit der angewandten Farblösungen, zur Standartmethode.

Färbetechnik:

1. Die Sputumausstriche werden in der Flamme fixiert.
2. Färben mit Carbolfuchsin unter Erwärmung bis zur Dampfbildung.
3. Entfärben mit Salzsäurealkohol.
4. Gegenfärben mit Methylenblau und Abspülen.

Bei dem später von dieser Färbung abgeleiteten Vorschriften findet man immer wieder die Behauptung, daß bei einer gelben Gegenfärbung mehr Tuberkelbazillen nachgewiesen werden könnten, als bei der blauen Ziehl-Neelsen'schen und daß weiterhin die roten Bazillen auf gelbem Untergrund besser sichtbar seien, als auf einem blauen.

Die Aufgabe meiner Untersuchungen ist es, einmal festzustellen, bei welcher Kombination bessere Ergebnisse erzielt worden sind und worin die Ursachen für diesen Erfolg zu suchen sind.

Karl Heinz Lange stellte fest, daß bei einer Nachbehandlung der mit Carbolfuchsin gefärbten und mit Salzsäurealkohol entfärbten Sputumausstriche, durch Lugol'sche Lösung oder noch erfolgreicher mit Jodtinktur, die Tuberkelbazillen dicker, etwas heller rötlich und häufiger granuliert erscheinen, als bei der klassischen Ziehl-Neelsen Färbung.

Die Versuche von R. Arabin ergaben, daß bei der Färbung mit Pikrinsäure nach der Vorschrift nach Bender ein Verdecktsein

der roten Tuberkelbazillenstäbchen, durch stark gelb gefärbte Sputumschichten nicht ein einzigesmal vorkam. Schwierigkeiten bereitete bei dieser Methode das Entfärben, sodaß die Bazillen an dick ausgestrichenen Sputumstellen nicht leuchtend rot, sondern rotbraun auf gelblichem Grund zu sehen waren.

Dr. Osol stellte durch Prüfung der Sputumfärbungen auf Tuberkelbazillen nach Ziehl-Neelsen, Konrich, Jötten-Haarmann und Bender fest, daß die Tuberkelbazillen auf dem hellgelben Grund der nach den zwei letzten Verfahren gefärbten Präparate leichter und schneller als auf dem dunkleren Grund des Ziehl-Neelsen Verfahrens entdeckt werden. Auch mengenmäßig ließen sich dabei bessere Ergebnisse erzielen, da der diesem Verfahren eigene hellere Grund es zuläßt, dickere Ausstriche herzustellen als dies nach dem Ziehl-Neelsen Verfahren möglich ist. Die roten Tuberkelbazillen sind in den hellgelben Schichten bedeutend besser und schneller als in den dunkleren Schichten eines mit Methylenblau nachgefärbten Präparates zu erkennen. Eine weitere Verdickung des Ausstriches scheitert aber auch hier an der Unmöglichkeit, in den, bei der Entfärbung bestehen bleibenden roten Flecke, nach der gelben Gegenfärbung, die Tuberkelbazillen zu unterscheiden.

Jedenfalls gelang es Dr. Osol an Hand von einem Untersuchungsmaterial von 6451 Sputumausstrichen zu zeigen, daß

1. auf hellem Grund stets bedeutend größere Mengen Tuberkelbazillen entdeckt werden als auf dem Ziehl-Neelsen Verfahren eigenen dunkelblauen Grund.
2. Daß bei der hellen Gegenfärbung Tuberkelbazillen auch da gefunden werden, wo die Ziehl-Neelsen'sche Methode versagt und zwar in Bezug auf die absolut positiven Befunde in einem Verhältnis von 100 : 151.

Die oben angegebenen, von Jötten-Haarmann durchgeführten Versuche ergaben, daß bei der gelben Gegenfärbung mit Pikrinsäure nach Spengler mehr positive Resultate erzielt wurden, als mit der Ziehl-Neelsen-Methode.

Von Ifikatris und D. Hadziemanuel (Griechenland) kamen zu dem Ergebnis, daß das Osol'sche Färbeverfahren im dicken Ausstrich ein Fortschritt auf dem Gebiete der Tuberkulosediagnostik und besonders für die Tuberkulosefürsorge geeignet ist. Auch sie stellten fest, daß nach der Methode von Spengler mit der gelben Gegenfärbung in mehr Sputumausstrichen Tuberkelbazillen festgestellt werden können, als nach der Ziehl-Neelsen Methode.

Carwalho kam zu dem Schluß, daß die Verschiedenheit der Resultate bei den neueren Färbemethoden nur von der Gegenfärbung abhängt und daß kein Zusammenhang mit der Entfärbung besteht.

Aus all diesen Arbeiten geht also eindeutig hervor, daß bei

der Gegenfärbung mit gelben Farbstoffen eine größere diagnostische Sicherheit besteht als bei der Methylenblaukombination nach Ziehl-Neelsen.

Eine Erklärung für diese Tatsache finden wir in den Veröffentlichungen der Versuche von Prof. von Angerer (Erlangen). Er ging einen ganz anderen Weg als den bisher immer beschrittenen. Wenn man bisher versucht hatte, durch Verwendung anderer Farbstoffe, das Auffinden der Tuberkelbazillen zu erleichtern, so versuchte von Angerer das angestrebte Ziel auf optischem Wege zu erreichen. Er ging dabei von der Voraussetzung aus, daß für das menschliche Auge zwei Gegenstände mit komplimentären Farbenverhältnis am besten zu erkennen sind; weiterhin daß 2 bestimmte spektrale Farben auf einer Farbkarte, wie z. B. rot und grün, besonders deutlich gemacht werden können, wenn man die Karte noch mit kombiniertem Rot- und Grünlicht beleuchtet. Seine Versuche gingen deshalb darauf hinaus ein Filter herzustellen, durch das die roten Tuberkelbazillen auf einem entsprechenden Untergrund besonders deutlich in Erscheinung treten.

„Um zu klaren Vorstellungen von der Beschaffenheit der zu fordernden Filter zu gelangen, wurden zunächst die spektralen Eigenschaften der bei der Ehrlich-Ziehl-Neelsen-Färbung zur Verwendung kommenden Farbstoffe, des Fuchsins sowie des Methylenblaus, näher untersucht. Erstaunlicherweise ergab sich, daß beide Farbstoffe in ihrer Kombinierung zur Kontrastfärbung durchaus nicht so geeignet sind, wie dies auf dem ersten Blick erscheinen mag. Das rote Fuchsin absorbiert, wie zu erwarten, den gesamten Bezirk von grün bis hinein in das violette Spektralende, für das es wieder durchlässig ist. Das Methylenblau hingegen absorbiert, außer im gelb und orange, wie zu verlangen, überdies noch einen beträchtlichen Teil des roten Spektrums. Das bedeutet aber, daß ein mit Fuchsin rot gefärbter Bazillus in mit Methylenblau gefärbte blaue Begleitmassen eingebettet, sich von dieser umsoweniger in der Farbe unterscheiden wird, je dichter die blauen Begleitmassen sind, ein Umstand, der häufig genug erfüllt ist. Die Ursache liegt klar, das die blauen Begleitstoffe durchsetzende Licht verliert durch das absorbierende Methylenblau einen großen Teil seiner Rotquote. Folglich ist der verbleibende Lichtrest so arm an rot geworden, daß ein rotgefärbter Tbc.-Bazillus so stark von blau und violett überstrahlt wird, daß er sich in seiner Farbe kaum vom Untergund abheben und darum leicht übersehen werden kann. Es ist also der zur Gegenfärbung benutzte Farbstoff, der bei falscher Wahl infolge seiner ungünstigen Absorptionseigenschaften zu an sich vermeidbaren diagnostischen Schwierigkeiten führen muß."

Auf einer schematischen Darstellung erläutert von Angerer die Absorptionsverhältnisse näher. Daraus ergibt sich, daß zur sinngemäßen Gegenfärbung jeder Farbstoff geeignet sein muß, der zwar ähnlich wie das Methylenblau das orange oder gelb absorbiert, dabei aber den roten Spektralanteil möglichst wenig oder gar nicht berührt. Diese Forderung wird in befriedigenderweise von dem nicht selten zur Kontrastfärbung benützten Malachitgrün erfüllt, mit dem weiteren Vorteil, daß es den überwiegenden Teil des violetten Spektralendes ebenfalls ausblendet. Es war offensichtlich, daß der Farbenkontrast eines mit Malachitgrün gegengefärbten Ziehl-Neelsen-Präparates noch um ein beträchtliches steigerungsfähig sein mußte, wenn man dafür Sorge trug, daß das Licht, welches das Präparat beleuchtet, bereits so verändert war, daß es nur diejenigen Spektralteile enthielt, die den Farben des Präparates, nämlich rot und blaugrün, entsprachen. Nach längerem Suchen konnte nach Kombination eines Violettfilters bestimmter Dichte mit einem definierten Gelbfilter eine sinngemäße Filterung des von einer 60-Watt-Osram-Nitrallampe gelieferten Lichtes erzielt werden. Auf beigefarbenem Untergund erschienen die Tbc.-Bazillen in auffallend leuchtender, rubinroter Farbe, das Begleitmaterial in einem reinen Grün."

Zusammenfassend läßt sich also zu den Ergebnissen all dieser Untersuchungen sagen, daß durch sie eindeutig bewiesen wurde, daß eine helle gelbe Gegenfärbung einer solchen mit Methylenblau vorzuziehen ist. Diese helle Gegenfärbung ermöglicht es einerseits, daß dickere Ausstriche untersucht werden können und somit die Auffindung der Tbc.-Bazillen erleichtert wird, falls nur wenige Bazillen im Sputum vorhanden sind, während bei der Methylenblaugegenfärbung der dick ausgestrichenen Präparate, sich die Sputumschicht so stark färbte, daß die Tbc.-Bazillen nur sehr schwer gefunden werden konnten, ist es bei einem hellen Untergrund viel leichter möglich, selbst von gelben Begleitmassen verdeckte rote Bazillen zu erkennen.

Die Erklärung für diese Tatsache fanden wir in den Veröffentlichungen von Prof. v. Angerer. Durch ihn wurde klargelegt, daß der Nachteil der Methylenblaugegenfärbung in der starken Überstrahlung von blau und violett gegenüber den rot gefärbten Tbc.-Bazillen liegt.

Zieht man nun die Konsequenzen aus diesen Untersuchungen, so läßt sich sagen, daß ein nach Ziehl bearbeitetes Sputum mit einer gelben Gegenfärbung die besten Ergebnisse zeitigen muß.

Bei den bisher bekannten gelben Gegenfärbungen traten aber immer ziemliche Schwierigkeiten auf.

1. Im hellen dicken Ausstrich nach Dr. Osol waren die roten Flecke im Präparat schlecht zu entfärben. Die von ihm ange-

gebene Entfärbungsflüssigkeit, mit der diese Schwierigkeit überwunden werden kann, ist jedoch unbeständig und muß alle 2 Tage erneuert werden.

2. Das Entfärben und die Gegenfärbung mit Pikrinsäurealkohol muß stets mehrmals wiederholt werden und ergibt meist einen rötlich gelben Grundton, der sich bei der Durchsuchung des Präparates auf rote Tbc.-Bazillen störend bemerkbar macht.

3. Die Nachbehandlung mit Jodtinktur oder Lugol'scher Lösung läßt stets die gleiche Erscheinung erkennen, daß nämlich unter dem Einfluß des Jods sich der protoplasmatische Inhalt der Stäbchen häufig zu kleinen Kügelchen zusammenzieht, welche dann reihenweise wie eine Kette von Kokken hintereinander liegen und auch zum Teil als solche angesprochen worden sind. Weiterhin erschien bei dieser Art der Gegenfärbung der Untergrund stets ziemlich blaß oder schmutzig gelb, sodaß die roten Tbc.-Bazillenstäbchen nicht gerade sehr deutlich hervortreten.

Ich war daher bestrebt bei meinen Versuchen eine gelbe Gegenfärbung zu erzielen, die die Nachteile der meist unvollkommenen Entfärbung aufwiegt und die roten Stäbchen auf dem hellgelben Grund klar und deutlich in Erscheinung treten läßt.

Im Verlauf meiner Färbungen von Sputa wandte ich daher als Gegenfärbemittel eine 3%ige wässrige Trypaflavinlösung an, sodaß die Färbung der Ausstriche technisch folgendermaßen verläuft:

1. Mäßig dicke Ausstriche werden an der Luft getrocknet und dann zur Fixierung 3 mal durch die Flamme gezogen.

2. Färben mit Carbolfuchsin unter Erwärmung bis zur Dampfbildung mit 2maligem Aufkochenlassen.

3. Entfärben in Salzsäurealkohol (10 Sekunden lang).
(100 ccm 70%iger Alkohol + 1 ccm konzentrierte Salzsäure.)

4. Abspülen in reinem Alkohol (½ Minute), darnach sofort mit Aqua dest.

5. Gegenfärbung mit Trypaflavinlösung (15 bis 20 Sek.).

6. Abspülen.

Die Tbc.-Bazillen erscheinen nach dieser Methode der Sputumfärbung leuchtend rot auf hellgelbem Untergrund.

An Hand von nahezu 200 Präparaten konnte ich feststellen, daß die oben angeführten Vorteile der gelben Gegenfärbung zutreffen und daß bei gleich vorbereiteten Sputumausstrichen, die Tbc.-Bazillen auf dem gelben Grund wesentlich schneller und zahlreicher in Erscheinung treten als auf dem blauen Grund der Methylenblaufärbung.

Dabei bietet die Trypaflavingegenfärbung noch folgende überzeugende Vorteile:

1. Die Lösung ist leicht herzustellen und sehr beständig.

2. Bedingt die starke Verdünnung der Trypaflavinlösung bei der Gegenfärbung einen gelb-grünlichen Grundton, dessen große Bedeutung in der Arbeit von Prof. von Angerer herausgestellt wurde.

3. Wird durch die Trypaflavinfärbung sehr deutlich und doch auch dicke Schichten sehr hell-durchsichtig gefärbt.

Durch die Ziehl-Trypaflavin-Kombination wird eine ausgezeichnete Kontrastfärbung erzielt, die für den Erfolg dieser Methode ausschlaggebend ist. Es werden zwar nicht mehr Bazillen gefärbt, aber Dank der guten Farbengegensätze, auf Grund der besseren optischen Wirkung mehr Bazillen gesehen.

Bei diesen vergleichenden Untersuchungen spielte auch die Lichtquelle eine wesentliche Rolle. Während bei Tageslicht, namentlich bei hellem klaren Wetter, der Vorteil der gelben Gegenfärbung sehr eindrucksvoll in Erscheinung tritt, verwischt dieser etwas beim Gebrauch einer künstlichen Lichtquelle. Die Ursache ist nach den obenbeschriebenen Erfahrungen nicht schwer zu erkennen. Ein nach Ziehl-Neelsen gefärbtes Sputum bekommt, wenn man das gleiche Gesichtsfeld mit seinem blauen Untergrund betrachtet, in dem Moment eine gelbliche Beimischung, wenn man mit dem Reflektor des Mikroskops nicht mehr Tageslicht, sondern künstliches Licht auffängt. Die Kontrastwirkung wird in diesem Augenblick eindrucksvoller und die roten Tbc.-Bazillenstäbchen leuchten selbst bei der blauen Gegenfärbung deutlicher auf.

Der Nachteil der starken Blauüberstrahlung bei der Ziehl-Neelsen'schen Methode, wird, wie oben angegeben, durch Vorschalten des Trockenfilters, nach von Angerer behoben. Der Filter kann allerdings nur in Verbindung mit einer künstlichen Lichtquelle angewandt werden.

Abschließend läßt sich also nach all den angestellten Versuchen feststellen daß folgende Kombinationen eine schnelle und zuverlässige Diagnosenstellung, ob Tuberkelbazillen im Sputum vorhanden sind oder nicht, ermöglichen:

1. Die Ziehl-Trypaflavin-Kombination, die sowohl bei Tages- als auch bei künstlichem Licht ausgezeichnete Ergebnisse zeitigt,

2. die Ziehl-Neelsen'sche Färbung, aber nur mit Benützung des von Prof. von Angerer angegebenen Filters, immer in Verbindung mit einer künstlichen Lichtquelle.

Literatur

1. **von Angerer u. H. Eyer:** Münch. Med. Wochenschr., 1935, I S. 348/49.
2. **Arabin:** Dokt. Diss. in Frankfurt a. M. 1936: Der Nachweis der Tbc.-Bazillen im Sputum.
3. **Beneke. R.:** Die Med. Welt Nr. 41, 1936, S. 1475.
4. **Carvalho:** Ztsch. Tbc. 63 H. 5, 1932.
5. **Flügge:** Die Mikroorganismen, Verl. Vogel, Leipzig, 1886.
6. **Hatano:** Berliner Klin. Wochenschr. Nr. 37, 1909.
7. **Herxheimer:** Technik der Pathologisch-Histologischen Untersuchungen, Verlag Bergmann, Wiesbaden, 1912.
8. **Jötten-Haarmann:** Dtsch. Med. Wochenschr. 1927, S. 1002.
9. **Lange:** Med. Welt, Nr. 23, 1936.
10. **Osol:** Dtsch. Med. Wochenschr. S. 1003.
11. **Schulte Tigges:** Dtsch. Med. Wochenschr. 1920, S. 1225.
12. **Ulrichs:** Dtsch. Med. Wochenschr. 1919, S. 468.

Für die freundliche Überlassung des Themas und die Übernahme des Referats sage ich hiermit Herrn Geheimrat Jamin meinen besten Dank.

Lebenslauf

Am 12. Mai 1913 wurde ich in Dortmund, als Sohn des Steuerinspektors Karl Mottel und seiner Ehefrau, Elisabeth, geb. Prüßmann geboren. Ich besuchte dort die Volksschule und das Bismarckrealgymnasium, wo ich im Jahre 1932 meine Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester 32 nahm ich in Erlangen mein Medizinstudium auf, legte im Sommer 34 meine Medizinische Vorprüfung ab und belegte während meiner klinischen Semester 4 in Erlangen und 2 in München. Am 19. November beendete ich in Erlangen mein Medizinisches Staatsexamen. Danach war ich als Medizinalpraktikant an der Medizinischen Poliklinik in München, an der Univ.-Hautklinik in Erlangen und an der chirurgischen Abteilung des Szent-Rokus-Spital in Budapest tätig.

Erich Mottel.